

文章编号: 1671 - 2897 (2005) 04 - 248 - 04

· 论著 ·

# RGS16与 p53在人胶质瘤中的表达及相关性研究

洪柳<sup>1</sup> 李青<sup>1</sup> 陈广生<sup>1</sup> 张丰<sup>1</sup> 聂蕾<sup>1</sup> 张丽英<sup>1</sup> 林圣彩<sup>2</sup> (<sup>1</sup>第四军医大学西京医院病理科, 陕西 西安 710033; <sup>2</sup>香港科技大学生物化学教研室, 香港 00853)

**摘要** 目的 研究 G蛋白信号调节子 16 (RGS16)与 p53在人胶质瘤中表达及其相关性。方法 利用免疫组织化学链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (SABC)法检测 42例胶质瘤标本中 RGS16与 p53的表达。结果 RGS16在 10例胶质瘤旁正常脑组织有 8例神经元阳性但胶质细胞阴性、42例胶质瘤中 37例肿瘤细胞阳性,二者差异显著 ( $P < 0.05$ ); p53在瘤旁正常脑组织中阴性,胶质瘤中 15例阳性,差异明显 ( $P < 0.05$ ); RGS16、p53表达均与病理分型、分级无关 ( $P > 0.05$ );其中, RGS16与 p53共同阳性表达 11例,共同阴性表达 1例, Kappa检验二者表达呈负相一致 ( $P < 0.05$ )。结论 RGS16在胶质瘤中高表达而与病理分级无关,推测 RGS16可能在胶质瘤发生中起作用。另外,胶质瘤中 RGS16与 p53表达呈负相关。

**关键词** 胶质瘤; RGS16; p53; 免疫组织化学

**中国图书资料分类号** R 737.9 **文献标识码** A

## Expression and relationship of RGS16 and p53 in human glioma

HONG Liu<sup>1</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, CHEN Guangsheng<sup>1</sup>, ZHANG Feng<sup>1</sup>, NIE Lei<sup>1</sup>, ZHANG Liying<sup>1</sup>, LIN Shengcai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Science & Technology University of Hong Kong, Hong Kong 00853, China

**Abstract** **Objective** To study the expression of RGS16 in human glioma and its relationship with p53. **Methods** The expression of RGS16 and p53 in protein level was studied by immunohistochemistry strept avidin-biotin-peroxidase-complex (SABC) method in 42 samples. **Results** In 10 normal brain tissues beside the human glioma, 8 cases expressed RGS16 in the neurons, but none in gliocytes; in 42 human gliomas, 37 cases expressed RGS16 in the glioma cells, and the difference between the normal tissue and the glioma was observed ( $P < 0.05$ ). The expression of p53 in the normal brain tissues and gliomas was 0 and 15 respectively, and the difference was observed ( $P < 0.05$ ). But the expression of RGS16 and p53 was not related to the different tumor types and the pathologic grades ( $P > 0.05$ ). Among the 42 gliomas, RGS16 and p53 were both positive expressed in 11 cases and both negative expressed in 1 case. Kappa test showed that RGS16 expression negative correlated with that of p53 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** RGS16 is highly expressed in the glioma, not relating with the pathologic grades, therefore RGS16 may play an important role in the carcinogenesis of glioma. Moreover, RGS16 expression negative correlated with that of p53.

**Key words** Glioma; Regulator of G-protein signaling 16; Protein p53; Immunohistochemistry

G蛋白信号调节子 (regulators of G-protein signaling, RGS)蛋白是近年发现的新蛋白质家族,结构中 包含一保守的 RGS结构域,使得几乎所有的

RGS蛋白具有三磷酸鸟苷水解酶激活蛋白 (GTPase activating protein, GAP)活性,对 G蛋白信号发挥负性调节作用。在 20余种 RGS家族中,有研究表明 RGS16是 p53的靶基因<sup>[1]</sup>, RGS16的过多表达将抑制 G蛋白偶联的丝裂原信号的传递及丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号活化。研究发现, RGS16促进大鼠胶质瘤细胞 C6的细胞周期运行,促进从 G1期到 S期过渡<sup>[2]</sup>。RGS16

基金项目: 军队医药卫生科研基金资助项目 (02ma04); 国家杰出青年自然科学基金资助项目 (30125012); 高等学校骨干教师及归国留学人员科研启动基金资助项目 ([1999]747)

作者简介: 洪柳, 硕士研究生, 电话: (029) 83374541-119, E-mail: hongliu@fmmu.edu.cn

的表达是否与人胶质瘤的发生有关?在这一过程中与 p53 是否相关?为此本研究利用免疫组织化学方法检测了 42 例胶质瘤手术标本中 RGS16 与 p53 的表达情况初步探讨这一问题。

## 材料与方法

### 一、材料

42 例胶质瘤标本取自西京医院病理科,经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片 4  $\mu\text{m}$  厚。病理诊断:星形细胞瘤 32 例,少突胶质细胞瘤 6 例,室管膜瘤 4 例;其中 10 例含瘤旁正常脑组织。按 WHO 神经系统肿瘤分类标准(2000 年)分为:Ⅰ级 17 例,Ⅱ级 15 例,Ⅲ级 10 例。兔抗 RGS16 抗体系香港科技大学林圣彩教授惠赠,工作浓度为 1  $\diamond$  50 稀释;兔抗人 p53 抗体购自 Santa Cruz 公司,工作浓度为 1  $\diamond$  150 稀释;生物素化山羊抗兔 IgG 试剂盒及浓缩型二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)购自武汉博士德公司。

### 二、方法

1. 免疫组织化学:采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(streptavidin-biotin-peroxidase complex, SABC)法,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)及同等稀释度的正常兔血清替代一抗作空白对照与替代对照。具体步骤如下:石蜡切片经常规脱蜡水化后,以 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  甲醇阻断内源性过氧化物酶 10 min;经微波修复抗原 5 min 冷

却至室温;正常山羊血清于室温下孵育 30 min,甩去不洗;滴加一抗 4 过夜,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;滴加生物素化的羊抗兔 IgG 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;滴加 SABC 复合物 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min;除 外每步均以 0.01 mol/L (pH 7.4) PBS 振洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色,苏木素衬染,脱水透明,中性树脂封片。

2 结果判断与统计处理:观察抗原表达部位、表达量及阳性分布,在 400 倍显微镜下随机选择 5 个以上视野,计数 1 000 个肿瘤细胞,计算其平均阳性细胞数。RGS16 以胞质或胞突出现棕黄色染色为阳性染色,p53 以胞核出现棕黄色染色为阳性染色,均以阳性细胞数大于 10% 为阳性表达(+ )。结果在 SPSS 11.0 下经  $\chi^2$  检验、Kappa 一致性检验统计分析。

## 结 果

### 一、RGS16 与 p53 在胶质瘤中的表达及与病理类型的关系

RGS16 主要表达于肿瘤细胞的胞浆及胞突(图 1), p53 主要表达于肿瘤细胞的胞核(图 2),个别也见于胞浆。42 例胶质瘤中, RGS16 有 37 例阳性表达,阳性率 88.10%;10 例瘤旁正常脑组织中未见胶质细胞阳性表达,但 8 例有正常神经元胞浆阳性(图 3),二者有显著性差异( $P=0.000<0.05$ )。p53 在 42 例胶质瘤中阳性表达 15 例,阳性率 35.71%;在瘤旁正常脑组织中未见胶质细胞阳性表达,二者有显著性差异( $P=0.025<0.05$ )。

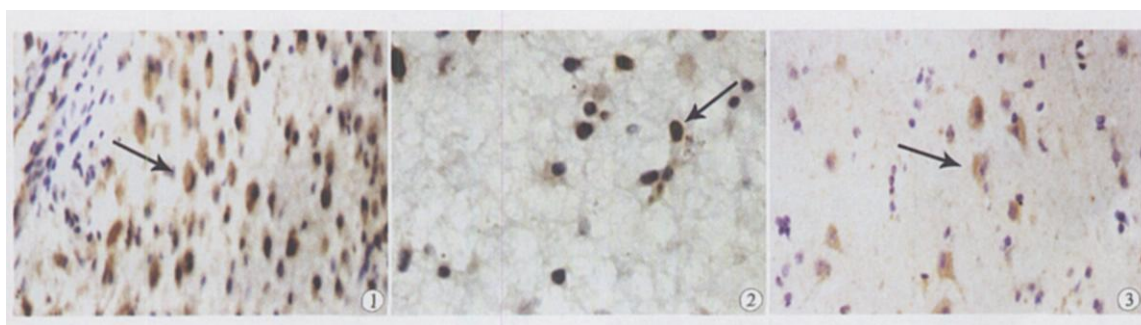


图 1 RGS16 在胶质瘤中肿瘤细胞胞浆中表达阳性(SABC,  $\times 200$ )

Fig 1 RGS16 expressed in cytoplasm of tumor cells in glioma by immunohistochemistry (SABC,  $\times 200$ )

图 2 p53 在胶质瘤中肿瘤细胞中核表达阳性(SABC  $\times 200$ )

Fig 2 p53 expressed in nucleolus of tumor cells in glioma by immunohistochemistry (SABC,  $\times 200$ )

图 3 瘤旁正常脑组织, RGS16 在神经元胞浆表达阳性而在胶质细胞表达阴性(SABC,  $\times 200$ )

Fig 3 In normal brain tissue beside the tumor, RGS16 expressed in neuron but not in gliocyte by immunohistochemistry (SABC,  $\times 200$ )

在 32 例星形胶质细胞瘤中, RGS16 阳性 30 例(93.75%), 6 例少突胶质细胞瘤中阳性 4 例(66.67%),

4 例室管膜瘤中阳性 3 例(75.00%);同样, p53 在星形胶质细胞瘤中阳性 13 例(40.63%), 少突胶质细胞瘤中阳

性 1 例 (16.67%), 室管膜瘤中阳性 1 例 (25%)。经统计分析: RGS16 与 p53 在几种不同病理类型的胶质瘤中的表达均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

### 二、RGS16 与 p53 表达与病理分级的关系

在 WHO 分级不同级别的胶质瘤中, RGS16 阳性表达分别为 ~ 级 15 例 (88.24%), ~ 级 13 例 (86.67%), ~ 级 9 例 (90.00%); p53 阳性表达分别为 ~ 级 6 例 (35.29%), ~ 级 5 例 (33.33%), ~ 级 4 例 (40%), 经统计分析表明 RGS16、p53 的表达均与病理分级无关 ( $P > 0.05$ )。

### 三、RGS16 与 p53 在人胶质瘤中表达的相互关系

本实验 42 例胶质瘤标本中, RGS16 与 p53 共同阳性表达 11 例, 共同阴性表达 1 例, Kappa 一致性检验表明, RGS16 与 p53 表达呈负相一致性 ( $P = 0.028 < 0.05$ , kappa 值为 -0.173) (见表 1)。

表 1 RGS16 与 p53 蛋白在胶质瘤中表达的相互关系 (例数)  
Tab 1 Relationship between RGS16 and p53 protein in glioma (cases)

RGS16	p53		n
	+	-	
+	11	26	37
-	4	1	5
n	15	27	42

## 讨 论

RGS 蛋白是近年发现的新蛋白质家族, 目前已有 20 余种, 广泛存在于真菌、原虫及哺乳动物细胞。其结构中均有一 130 个氨基酸残基的保守序列即 RGS 结构域, 与 G 亚单位结合发挥 GAP 活性, 负性调节 G 蛋白信号。近年发现 RGS 蛋白不仅具有 GAP 作用抑制 G 蛋白信号, 也是 G 蛋白信号的调节子与整合子, 比如参与调节一些离子通道、光信号的开启, 结合一些与信号通路有关的 G 蛋白而参与细胞的增殖、分化、趋化及细胞间的相互作用<sup>[3]</sup>。这些显示了 RGS 蛋白无论是在生理还是在疾病中都起重要作用。

1996 年 Lin 等<sup>[4]</sup>首次从小鼠垂体中分离出 RGS16 的 cDNA 并显示分布于肝脏和垂体, 1998 年 Snow 等<sup>[5]</sup>发现它在人视网膜高表达, 后有报道 RGS16 在人表达于脑、心脏、肺、肾、骨骼肌、小肠、淋巴细胞、胎盘、睾丸等组织<sup>[6]</sup>, 但这些都是 mRNA 水平的检测。研究还表明 RGS16 的作用是多方面的, 如参与炎症、过敏反应<sup>[7]</sup>和视网膜光信号的转导<sup>[5]</sup>, 参与对 p38 通路的活化的负向调节<sup>[8]</sup>, 还可能参与脂

代谢<sup>[9]</sup>, 但尚未见到与肿瘤相关的报道。Buckbinder 等<sup>[1]</sup>的研究发现野生型 p53 可诱导 RGS16 表达, RGS16 的过多表达将抑制 G 蛋白偶联的丝裂原信号的传递及 MAPK 信号活化, 推论 p53 可能通过 RGS16 调节 G 蛋白偶联受体通路从而调解细胞对生长或生存因子反应的敏感性。p53 基因是目前研究比较明确的一种参与细胞周期调控的抑癌基因, 通常认为正常 (野生型) p53 能将 DNA 受损的细胞阻滞于 G1 期, 直至 DNA 损伤被修复, 否则启动细胞凋亡机制将 DNA 损伤无法修复的细胞清除<sup>[10,11]</sup>。那么, RGS16 作为 p53 的靶基因起什么作用? RGS16 是否也参与细胞周期的调控? 与肿瘤是否有关? 我们曾报道<sup>[2]</sup>, RGS16 促进大鼠胶质瘤细胞 C6 从 G1 期到 S 期过渡。本实验在蛋白水平上表明 RGS16 在瘤旁脑组织的胶质细胞中没有表达而在神经元中有表达, 但是 RGS16 在胶质瘤肿瘤细胞的胞浆、胞突中高表达 (表达率为 88.10%), 而 RGS16 的表达在胶质瘤不同的病理级别间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。该结果提示: RGS16 可能参与胶质瘤的发生, 而与胶质瘤进展关系不大; RGS16 在正常神经元中表达, 可能参与一些 G 蛋白偶联受体有关的神经信号的传递。另外, 还发现 RGS16 与 p53 的表达呈负相一致性 ( $P < 0.05$ ), 由于 p53 蛋白半衰期的特性, 免疫组化方法检测到的多是突变型 p53 蛋白<sup>[12]</sup>。所以本研究发现的是 RGS16 与突变型 p53 的表达呈负相一致性, 这与文献<sup>[1]</sup>报道的 RGS16 与野生型 p53 的表达呈正向一致性的结果是一致的, 但其机制还有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Buckbinder L, Velasco-Miguel S, Chen Y. The p53 tumor suppressor targets a novel regulator of G protein signaling [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (15): 7868 - 7872.
- 2 张丰, 李青, 章必成, 等. 过度表达 G 蛋白调节子 16 促进大鼠胶质瘤 C6 细胞增殖 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23 (10): 950 - 952.
- 3 Hollinger S, Hepler JR. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling [J]. Pharmacol Rev, 2002, 4 (3): 527 - 559.
- 4 Chen C, Zheng B, Han J, et al. Characterization of a novel mammalian RGS protein that binds to Gα proteins and inhibits pheromone signaling in yeast [J]. J Biol Chem, 1997, 272 (13): 8679 - 8685.
- 5 Snow BE, Antonio L, Suggs S, et al. Cloning of a retinally abundant regulator of G protein signaling (RGS-r/RGS16): genomic structure and chromosomal localization of the human gene [J]. Gene, 1998, 206 (2): 247 - 253.
- 6 Wieland T, Chen CK. Regulators of G protein signaling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of

- signaling via heterotrimeric G proteins [J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1999, 360(1): 14 - 26.
- 7 Lippert E, Yowe DL, Gonzak JA, et al Role of regulator of G protein signaling 16 in inflammation-induced T lymphocyte migration and activation [J]. J Immunol, 2003, 171(3): 1542 - 1555.
- 8 Zhang Y, Neo SY, Han J, et al RGS16 attenuates galphaq-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor [J]. J Biol Chem, 1999, 274(5): 2851 - 2857.
- 9 Zheng B, Chen D, Farquhar MG MR16, a putative membrane glycerophosphodiester phosphodiesterase, interacts with RGS16 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(8): 3999 - 4004.
- 10 Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia [J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1287(2 - 3): 77 - 102.
- 11 赵世光, 李力仙, 叶远柱, 等. 胶质瘤细胞周期蛋白、p53表达和DNA含量分析 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2004, 3(2): 153 - 154.
- 12 Momand JG, Zambetti GP, Olson DG, et al The MDM2 onco-gene product form a complex with the p53 protein and inhibited transactivation [J]. Cell, 1992, 69(7): 1237 - 1245.
- (收稿日期: 2004 - 08 - 16; 修回日期: 2004 - 11 - 20)

## 第一届全国神经肿瘤大会暨第五届北京国际微创神经外科学术研讨会会讯

中华医学会神经外科学分会主办的第一届全国神经肿瘤大会暨第五届北京国际微创神经外科学术研讨会定于 2005 年 9 月 3 ~ 6 日在北京国际饭店举行。赵继宗教授和周良辅教授共同担任大会主席。本次会议为国家级医学继续教育项目, 参会代表可获得国家 I 类继续教育学分 8 分。本次会议邀请到美国著名神经外科专家 James Ausman, Daniel Barrow 和 Robert Grossman 教授作专题讲座, 并特邀德国微创神经外科专家 Alex Perneczky 教授现场手术演示, 同时还将安排北京天坛医院的神经外科手术转播。欢迎全国各地神经外科医生和相关专业人员积极参加。

报名联系地址: 北京市崇文区天坛西里 6 号, 首都医科大学附属北京天坛医院神经外科, 邮编 100050。联系人: 康帅, 电话: (010) 67016611 转 2323, 传真 (010) 65113440。E-mail: tsw@public3.bta.net.cn

神经肿瘤会议组稿工作由复旦大学附属华山医院神经外科负责, 征文内容包括: 颅脑和脊髓肿瘤临床和基础各领域的论文。欢迎神经肿瘤相关学科 (神经外科、神经内科、神经病理、神经影像、放疗、化疗、儿童肿瘤和肿瘤生物学等的临床和基础研究) 专业人员踊跃投稿和参会。

论文要求: 800 ~ 1000 字的摘要, 包括目的、方法、结果、结论四个部分, 注明姓名、工作单位、地址、邮编及联系电话和电子邮件地址, 请用 A4 纸、4 号字排版并附软盘 1 份 (Word 格式)。

欢迎通过 E-mail: jzhu@fudan.edu.cn 投稿。

征文截稿日期: 2005 年 7 月 15 日

论文请寄: 上海市乌鲁木齐中路 12 号 华山医院 神经外科 王振霄 收

邮编: 200040

联系人: 复旦大学附属华山医院 朱剑虹

电话: (021) 62489999 - 6735

传真: (021) 62492884

E-mail: jzhu@fudan.edu.cn

会议还设神经外科护理和手术室护理专题研讨内容, 也欢迎神经外科和手术室护理人员积极参加会议。